动 物 学 研 究 2000, Dec. 21 (6): 432~436 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

四个鲫鱼品系线粒体DNA的限制性酶切分析

黎双飞 刘少军 刘 筠[①] 张轩杰 罗 琛
(湖南师范大学生命科学学院 长沙 410081 sfli@schu.com)

摘要：用差速离心和核酸酶消化法从红鲫（*C. auratus* red var.）、湘鲫［F_1 *hybrids of red crucian carp* (♀) × common carp (♂)］、野鲫（*C. auratus auratus*）和白鲫（*C. auratus cuvieri*）的肝组织及白鲫的卵巢中提取和纯化线粒体DNA。用9种内切酶（*Eco* RⅠ、*Hin* dⅢ、*Pst* Ⅰ、*Bgl* Ⅱ、*Bam* HⅠ、*Xho* Ⅰ、*Xba* Ⅰ、*Sal* Ⅰ和*Kpn* Ⅰ）进行单酶酶解，经琼脂糖凝胶电泳分析，检测出*Pst* Ⅰ、*Kpn* Ⅰ和*Bgl* Ⅱ 3种酶在品系间存在限制性片段长度多态性，但并未检测出品系内的限制性片段长度多态性。计算出红鲫、湘鲫、白鲫和野鲫的mtDNA大小分别约为16.19、16.02、16.60和16.06 kb。根据限制性酶切片段共享度，计算出4个品系间的遗传距离，结果表明存在直接亲缘关系的红鲫与湘鲫之间的遗传差异最小，证实了红鲫与子代湘鲫之间mtDNA遵循母系遗传的特性。

关键词：鲫鱼；线粒体DNA；限制性内切酶；遗传距离
中图分类号：Q953 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853(2000)06-0432-05

鱼类线粒体基因组与其他脊椎动物一样，是核外能进行自主复制的遗传物质。基因组具有结构简单且较为保守、分子量较小（15.2~19.8 kb）、进化速度快、遵循母系遗传和易于分离、纯化等特点(张亚平等，1992；吕国庆等，1998)。从70年代中期线粒体DNA限制性酶切分析开始应用于动物群体遗传结构分析、分子分类学和系统进化等研究领域以来，目前该技术在鱼类生物学研究领域已得到广泛应用，并取得了显著成绩(张四明等，1992；张辉等，1998；曹胥等，1997；John等，1994；Michael等，1997)。

鲫鱼（*Carassius auratus*）是一种杂食性中型鱼类，分布广泛，品系繁多（包括许多亚种、引进种群和人工选育的杂交种群等），是我国池塘养殖的主要对象之一。本文报道的红鲫和野鲫是在湖南采集的地方种群；白鲫又名大阪鲫，原产于日本，属于引进种；湘鲫是80年代湖南师范大学生命科学学院与湘阴县东湖渔场合作，用红鲫（♀）与湘江野鲤（♂）杂交得到的具有明显生长优势的杂交一代（F_1），已在生产中推广养殖。本文采用mtDNA限制性酶切分析技术，对红鲫、湘鲫、白鲫和野鲫的mtDNA酶切结果进行比较，试图探讨4个鲫鱼品系间的遗传进化和亲缘关系，揭示mtDNA母系遗传的特性。

1 材料与方法

1.1 材料来源

红鲫（*C. auratus* red var.）15尾取自本研究室实验基地，湘鲫［F_1 hybrids of red crucian carp (♀) × common carp (♂)］和白鲫（*C. auratus cuvieri*）各6尾由湘阴县东湖渔场提供，野鲫（*C. auratus auratus*）15尾，为长沙市郊的野生种群。实验鱼活体运回实验室，放置水箱内饥饿2~3 d，实验前放血，取新鲜肝组织（或卵巢）10~15 g。

1.2 试 剂

除琼脂糖和蔗糖为国产分析纯外，识别6个碱基对的9种限制性内切酶(*Eco* RⅠ、*Hin*dⅢ、*Pst* Ⅰ、*Bgl* Ⅱ、*Bam* HⅠ、*Xho* Ⅰ、*Xba* Ⅰ、*Sal* Ⅰ和*Kpn* Ⅰ）以及核酸酶和其他主要生化试剂均购自北京华美生物工程公司。

1.3 方 法

采用差速离心和核酸酶消化法从肝组织或卵巢中提取和纯化mtDNA，提取和纯化的具体步骤以及mtDNA的限制性内切酶酶解条件见已报道文献

收稿日期：2000-05-25；修改稿收到日期：2000-07-24
基金项目：湖南省自然科学基金重点资助项目
①通讯作者，通讯地址：湖南师范大学生命科学学院鱼类室，邮编：410081，电话：0731-8872552

（黎双飞等，2000）。

1.4 酶切片段凝胶电泳

采用平板电泳，琼脂糖凝胶浓度为0.8%～1.0%（含0.5 mg/L溴化乙锭），电压为6～8 V/cm，4℃条件下电泳3～4 h。

1.5 数据分析

以λDNA/*Hin* dⅢ的完全酶切片段作为相对分子量标准，利用凝胶电泳图像分析仪（Gel-Pro Analyzer，美国基因有限公司GDS8000PC）扫描和摄影，直接计算出酶解片段的长度和mtDNA的大小。

根据Nei等（1979）建立的"利用限制性内切酶研究遗传差异的数学模型"，计算品系间的限制性片段共享度（F）和遗传距离（P）。公式如下：

$$F = 2N_{XY}/(N_X + N_Y)$$

$$P = 1 - \{0.5[(F^2 + 8F)^{0.5} - F]\}^{1/r}$$

其中N_X、N_Y分别为品系X和Y的限制性酶切片段总数，N_{XY}为两个群体的片段共享数，r是实验选用的限制性内切酶能识别的碱基对数目。

2 结果与讨论

2.1 mtDNA酶解片段的检测及分析

用限制性内切酶*Eco* RⅠ、*Hin* dⅢ、*Pst* Ⅰ、*Bgl* Ⅱ、*Bam* HⅠ、*Xho* Ⅰ、*Xba* Ⅰ、*Sal* Ⅰ和*Kpn* Ⅰ酶切红鲫、湘鲫、白鲫和野鲫的mtDNA后，经琼脂糖凝胶电泳酶切分析，分别产生21、20、19和20个酶切片段（图1）。以λDNA/*Hin*dⅢ的完全酶切片段作为相对分子量标准，计算出酶切片段长度，并推算出红鲫、湘鲫、白鲫和野鲫mtDNA分子大小分别为(16.19±0.13)、(16.02±0.09)、(16.60±0.09)和(16.06±0.17) kb，其分子量分别为(10.69±0.09)×10^6^、(10.57±0.06)×10^6^、(10.96±0.06)×10^6^和(10.60±0.11)×10^6^ D。测得的4种鲫鱼mtDNA的分子大小与吕国庆等(1998)报道的鱼类mtDNA分子大小在15.2～19.8 kb相符合。白鲫mtDNA分子大小与张四明等(1992)报道的结果[(16600±130) bp]一致；而张四明等（1992）和张辉等（1998）曾分别报道过野鲫（均为地方野生种群）mtDNA分子大小为(15540±140)和(16340±170) bp，与本文报道的野鲫mtDNA分子大小均存在差异，说明野鲫mtDNA分子存在地域性遗传差异。红鲫和湘鲫的mtDNA酶切分析在国内还未见有报道。

由表1可以看出，9种酶在4个鲫鱼品系的mtDNA上均存在酶切位点，并未检测出品系内限制性片段长度多态性，但张辉等（1998）曾报道在1个野生鲫鱼种群中检测出3种单倍型和多倍体鲫鱼mtDNA群体内存在遗传多态性，作者认为这可能与实验材料来源的地域性狭窄、取材随机性小以及红鲫、湘鲫均为人工选择后的驯养群体等因素有关。同时比较红鲫、湘鲫、白鲫和野鲫的酶解结果可发现，在使用的9种内切酶中，仅*Pst* Ⅰ、*Bgl* Ⅱ和*Kpn* Ⅰ存在品系间限制性片段长度或酶切位点的差异，但未能找出一种可以同时区别4个品系而作为遗传标记的酶，其余6种酶酶切位点数一致，仅在片段长度上有较小差异。说明存在亲缘关系的品系线粒体DNA基因组在进化上表现出较为高度的保守性。

2.2 品系间遗传距离和亲缘关系的分析

根据mtDNA的限制性片段长度差异，计算出红鲫、湘鲫、白鲫及野鲫mtDNA的片段共享度（F）和遗传距离（P）（表2）。从表2可知红鲫、湘鲫、白鲫及野鲫4个品系mtDNA经9种内切酶酶解后产生的限制性片段共享度较高（0.75～0.927），也就是说品系间的遗传距离即核苷酸歧异度均较小（0.43%～1.63%）。实验结果在分子水平上进一步证实红鲫、湘鲫、白鲫与野鲫在起源和群体演化上存在亲缘关系。

在4个鲫鱼品系中，湘鲫是以红鲫为母本与湘江野鲤杂交得到的杂种一代，实验结果表明湘鲫与红鲫之间核苷酸的歧异度最小（0.43%）以及内切酶*Bgl* Ⅱ是唯一可作为区别湘鲫和红鲫的分子遗传标记。参照黎双飞等（2000）已报道的普通鲤鱼mtDNA的酶切结果，可以得出湘鲫与其亲本之间核苷酸歧异度的比较结果（表3）。从表3可以看出红鲫与湘鲫和野鲤mtDNA之间的核苷酸歧异度分别为14.32%和11.58%，两者之间均存在明显差异。根据我们已知的三者之间亲缘关系，可知属间（红鲫、野鲤分别属于鲤科鱼类鲫属、鲤属）mtDNA核苷酸歧异度十分明显，说明mtDNA种间的遗传多态性和种内进化上的保守性。而分别比较湘鲫与母本红鲫和父本野鲤之间的遗传距离，其差异显著，证实了mtDNA母系遗传的特性，为研究mtDNA母系遗传提供了证据。

红鲫、白鲫和野鲫是鲤科鲫属同一物种（*Carassius auratus*）经历漫长的演化过程及人工不断选育和驯化而形成的不同亚种。红鲫体形、生长速度

表 1 红鲫、湘鲫、白鲫和野鲫 mtDNA 限制性片段长度

Table 1 The restriction fragments length of the mtDNAs from *C. auratus* red var., hybrids, *C. auratus cuvieri* and *C. auratus auratus*

酶 (enzyme)	鱼 (fishes)	酶切片段长度/kb (the length of restriction fragments) /kb	合计 (total)
Pst Ⅰ	红鲫	13.15 2.90	16.05
	湘鲫	13.00 2.95	15.95
	白鲫	11.50 5.10	16.60
	野鲫	12.90 3.05	15.95
Eco RⅠ	红鲫	7.25 7.25 1.10 0.6①	16.20
	湘鲫	7.10 7.10 1.10 0.7①	16.00
	白鲫	7.30 7.30 1.20 0.7①	16.50
	野鲫	7.15 7.15 1.10 0.75①	16.15
Kpn Ⅰ	红鲫	9.75 6.38	16.13
	湘鲫	9.80 6.25	16.05
	白鲫	16.55	16.55
	野鲫	11.20 4.90	16.10
Bam HⅠ	红鲫	12.65 3.50	16.15
	湘鲫	12.70 3.40	16.10
	白鲫	12.70 3.85	16.55
	野鲫	12.80 3.40	16.20
Hin dⅢ	红鲫	7.20 5.05 2.20 1.10 0.6①	16.15
	湘鲫	6.95 5.10 2.10 1.20 0.6①	15.95
	白鲫	7.50 5.10 2.30 1.10 0.7①	16.70
	野鲫	7.20 5.00 2.20 1.0 0.6①	16.00
Bgl Ⅱ	红鲫	14.75 1.60	16.35
	湘鲫	15.90	15.90
	白鲫	16.55	16.55
	野鲫	16.15	16.15
Xho Ⅰ	红鲫	16.20	16.20
	湘鲫	16.10	16.10
	白鲫	16.60	16.60
	野鲫	16.10	16.10
Sal Ⅰ	红鲫	16.30	16.30
	湘鲫	16.10	16.10
	白鲫	16.75	16.75
	野鲫	15.90	15.90
Xba Ⅰ	红鲫	11.55 4.60	16.15
	湘鲫	11.50 4.55	16.05
	白鲫	11.70 4.90	16.60
	野鲫	11.40 4.60	16.00
平均长度/kb (the average length) /kb		红鲫	16.19±0.13
		湘鲫	16.02±0.09
		白鲫	16.60±0.09
		野鲫	16.06±0.17

①示未能检测出的较小片段 (the minor fragments not being detected)。

表 2 4个品系 mtDNA 的片段共享度和遗传距离

Table 2 The proportion of restriction fragments shared and genetic distances of the mtDNAs from the four strains

	红鲫	湘鲫	白鲫	野鲫
红鲫	21	0.927	0.75	0.829
湘鲫	0.43	20	0.821	0.90
白鲫	1.63	1.12	19	0.821
野鲫	1.06	0.59	1.12	20

对角线上的数字表示检测到的限制性片段 (the date on the diagonal are the detected restriction fragments)。

表 3 湘鲫与其亲本 mtDNA 片段共享度 (右上角) 和遗传距离

Table 3 The proportion of restriction fragments shared (upper right) and genetic distances of the mtDNAs from hybrids and its parents

	红鲫	湘鲫	野鲤
红鲫		0.927	0.098
湘鲫	0.43		0.15
野鲤	14.32	11.58	

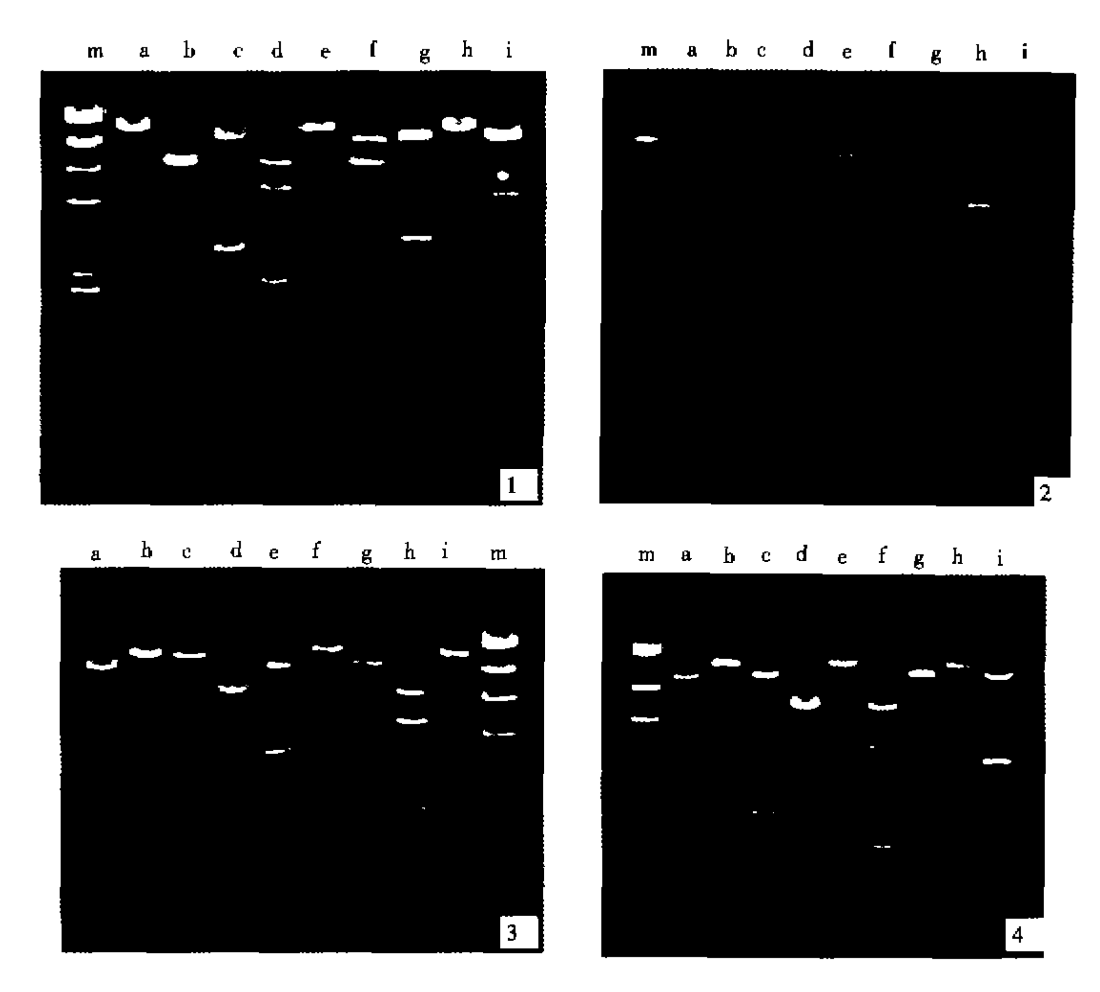


图 1~4　4 个品系的 mtDNA 酶切电泳图谱

Figs. 1-4　Electrophoresis patterns of mtDNA from the four strains by restriction endonucleases digestion

1：红鲫（*C. auratus* red var.）；2：湘鲫（hybrids）；3：白鲫（*C. auratus cuvieri*）；4：野鲫（*C. auratus auratus*）；1-4：m. λDNA/*Hin*dⅢ marker；1a：*Xho* Ⅰ；1b：*Bgl* Ⅱ；1c：*Sal* Ⅰ；1d：*Eco*R Ⅰ；1e：*Pst* Ⅰ；1f：*Hin*dⅢ；1g：*Bam*H Ⅰ；1h：*Kpn* Ⅰ；1i：*Xba* Ⅰ；2a：*Sal* Ⅰ；2b：*Eco*R Ⅰ；2c：*Pst* Ⅰ；2d：*Hin*dⅢ；2e：*Xho* Ⅰ；2f：*Kpn* Ⅰ；2g：*Bam*H Ⅰ；2h：*Bgl* Ⅱ；2i：*Xba* Ⅰ；3a：*Pst* Ⅰ；3b：*Xho* Ⅰ；3c：*Kpn* Ⅰ；3d：*Eco*R Ⅰ；3e：*Bam*H Ⅰ；3f：*Sal* Ⅰ；3g：*Xba* Ⅰ；3h：*Hin*dⅢ；3i：*Bgl* Ⅱ；4a：*Kpn* Ⅰ；4b：*Sal* Ⅰ；4c：*Pst* Ⅰ；4d：*Eco*R Ⅰ；4e：*Bgl* Ⅱ；4f：*Hin*dⅢ；4g：*Bam*H Ⅰ；4h：*Xho* Ⅰ；4i：*Xba* Ⅰ. The fragments length of λDNA/*Hin*dⅢ marker from top to bottom in Fig. 1-4 are 23 130, 9 416, 6 557, 4 361, 2 322 and 2 027 bp, respectively.

等与野鲫相似，亮丽的体色使它成为一种非常普遍的观赏鱼，白鲫生长速度明显比红鲫和野鲫快，但由于肉质不鲜，目前在国内市场不是很受欢迎。由表 1 的结果可知，在 9 种内切酶中，唯一可以同时区别红鲫、白鲫和野鲫 mtDNA 的内切酶是 *Kpn* Ⅰ，因此可以用它作为遗传标记。如果依据 Brown 等（1979）提出的每 100 万年 mtDNA 平均碱基突变速率为 2%计算，白鲫与红鲫大约在 200 万年前从鲫鱼群体中分化而来。由于红鲫和白鲫受分化前 mtDNA 可能存在差异等因素的影响，加之进化速度快可能导致分化了的基因趋同，用 mtDNA 分子钟估算得到的分离时间一般偏低。

实际利用 mtDNA 的限制性片段长度多态估算品系间的分化时间时，由于没有考虑 mtDNA 回复突变以及群体内的渐渗和遗传上的选择性等因素影响，估算结果可能有偏差，并且 Brown 等提出的假设是通过研究哺乳动物后得出的。根据实验结果，湘鲫与野鲫间的核苷酸歧异度（0.59%）明显比红鲫与野鲫间的低，其原因与湘鲫 mtDNA 突变有关。湘鲫 mtDNA 经 *Bgl* Ⅱ 酶切后仅检测出 1 个酶切位点，与野鲫和白鲫一致，与母本红鲫（2 个切点）有区别。如果用同样的方法计算湘鲫与红鲫、湘鲫与野鲫的分化时间，得到的结果肯定与我们已知的它们之间的进化关系相矛盾。由此可见，利用

Brown等提出的假设计算人工选育的杂交后代与其亲本之间的分化时间是不合适的。

参 考 文 献

张亚平、施立明，1992. 动物线粒体DNA多态性的研究概况[J]. 动物学研究，13(3)：289－298. [Zhang Y P, Shi L M, 1992. The survey on the studies of animal mitochondrial DNA. *Zoological Research*, 13(3): 289－298.]

吕国庆，李思发，1998. 鱼类线粒体DNA多态研究和应用进展[J]. 中国水产科学，5(3)：94－103. [LV G Q, Li S F, 1998. Advances in the study and application of fish mitochondrial DNA polymorphism. *Journal of Fishery Sciences of China*, 5(3): 94－103.]

张四明、龙 华，张兴忠，1992. 方正银鲫、白鲫与鲫线粒体DNA限制性内切酶酶切比较[J]. 水产学报，16(2)：120－129. [Zhang S M, Long H, Zhang X Z, 1992. Comparative study on restriction endonuclease digestion of mtDNAs of *Carassius auratus gibelio*, *C. auratus cuvieri* and *C. auratus auratus*. *Journal of Fisheries of China*, 16(2): 120－129.]

张 辉、董新红，叶玉珍等，1998. 三个三倍体鲫鱼品系及野鲫mtDNA的比较研究[J]. 遗传学报，25(4)：330－336. [Zhang H, Dong X H, Ye Y Z *et al*, 1998. Comparative studies of the mtDNA from three strains of triploid *Carassius auratus* and *C. auratus auratus*. *Acta Genetic Sinica*, 25(4), 330－336.]

曹 萱、夏德全，1997. 尼罗非鲫和奥利亚非鲫线粒体DNA遗传差异的研究[J]. 水产学报，21(4)：360－364. [Cao Y, Xia D Q, 1997. Studies on the heritable difference of mtDNA from *Oreochromis niloticus* and *O. aureus*. *Journal of Fisheries of China*, 21(4): 360－364.]

黎双飞，刘少军，刘 筠等，2000. 鲤鱼肝组织线粒体DNA的限制性内切酶分析[J]. 生命科学研究，4(2)：178－182. [Li S F, Liu S J, Liu Y *et al*, 2000. Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA from liver of common carp. *Life Science Research*, 4(2): 178－182.]

John R G, Linda R R, 1994. Mitochondrial DNA variation among red fishers from the Gulf of Mexico[J]. *Fisheries Research*, 20(2－3): 137－150.

Michael M H, Karen-Lise D M, Gorm R *et al*, 1997. Genetic variation within and among Danish brow trout (*Salmo trutta* L) hatchery strains, assessed by PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA segments[J]. *Aquaculture*, 153(1－2): 15－29.

Nei M, Li W H, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5269－5273.

ANALYSIS ON THE RESTRICTION FRAGMENTS' LENGTH OF THE MITOCHONDRIAL DNA FROM FOUR STRAINS OF *Carassius auratus*

LI Shuang-Fei LIU Shao-Jun LIU Yun ZHANG Xuan-Jie LUO Chen

(*College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha* 410081, *China* *sfli@schu.com*)

Abstract: The mitochondrial DNAs (mtDNAs) from liver of *C. auratus* red var., F_1 hybrids of red crucian carp (♀) × common carp (♂), *C. auratus cuvieri* and *C. auratus auratus* and ovary of *C. auratus auratus* were isolated and purified by the means of differential centrifugation and nuclease digestion. After having been digested by 9 restriction endonucleases (*Eco*R Ⅰ, *Hin*dⅢ, *Pst* Ⅰ, *Bgl* Ⅱ, *Bam*H Ⅰ, *Xho* Ⅰ, *Xba* Ⅰ, *Sal* Ⅰ and *Kpn* Ⅰ), the mtDNAs were analysed by using agarose gel electrophoresis. The results showed that *Pst* Ⅰ, *Kpn* Ⅰ and *Bgl* Ⅱ were the restriction fragments length polymorphism among four strains, but without the polymorphism within strains. The mitochondrial DNA size was about 16.19 kb in *C. auratus* red var., 16.02 kb in hybrids, 16.60 kb in *C. auratus cuvieri* and 16.06 kb in *C. auratus auratus* respectively. According the proportion of shared restriction fragments, the genetic distances between strains were calculated. The results manifested that the genetic distance was the smallest between *C. auratus* red var. and its filial generation hybrids, and that mtDNA followed the character of matrilinear inheritance.

Key words: *Carassius auratus*; Mitochondrial DNA (mtDNA); Restriction endonuclease; Genetic distance